

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
ELÉTRICA**

Luciana Costa Ramos

**ESTUDO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE SUSPENSÕES
DE CÉLULAS BIOLÓGICAS DURANTE APLICAÇÃO DE
CAMPOS ELÉTRICOS INTENSOS COM MICRODISPOSITIVO**

Florianópolis

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
ELÉTRICA**

**ESTUDO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE
SUSPENSÕES DE CÉLULAS BIOLÓGICAS DURANTE
APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS INTENSOS COM
MICRODISPOSITIVO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

Orientadora: Prof^ª. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr^ª.

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ramos, Luciana Costa

Estudo da condutividade elétrica de suspensões de células biológicas durante aplicação de campos elétricos intensos com microdispositivo / Luciana Costa Ramos ; orientadora, Daniela Ota Hisayasu Suzuki - Florianópolis, SC, 2016.

59 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica.

Inclui referências

1. Engenharia Elétrica. 2. eletroporação. 3. suspensão de células. 4. microdispositivo. 5. condutividade. I. Suzuki, Daniela Ota Hisayasu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica. III. Título.

Luciana Costa Ramos

**ESTUDO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DE SUSPENSÕES
DE CÉLULAS BIOLÓGICAS DURANTE APLICAÇÃO DE
CAMPOS ELÉTRICOS INTENSOS COM MICRODISPOSITIVO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Elétrica, Área de Concentração Engenharia Biomédica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 16 de fevereiro de 2016.

Prof. Carlos Galup Montoro, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

Banca Examinadora:

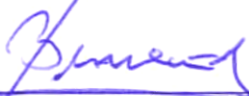
Prof.^a Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr.^a
Orientadora – Presidente da Banca
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Ailton Ramos, Dr.
Universidade do Estado de Santa Catarina

Banca Examinadora (continuação):



Christine Fredel Boos, Dr^a.
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. José Marino Neto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido Cícero,
e aos meus filhos Felipe e Gustavo, por
estarem sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À professora Daniela por toda orientação, dedicação e incentivo ao longo desse processo, sempre acreditando no que há de melhor em mim.

Às alunas da professora Fátima R. M. B. Silva do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais da UFSC, por fazer a realização dos experimentos possíveis.

Ao aluno Guilherme pelo suporte dado durante os experimentos.

Às minhas amigas Elzi e Rita, por estarem dispostas a melhorar meus textos.

Aos professores da Engenharia Biomédica pela formação, apoio e tempo dedicado.

Aos meus colegas de mestrado Diego, Jorge, Marjorie e Mayara pela amizade, motivação e troca de experiências.

À minha assistente Adriana, por fazer todo possível que fosse necessário para me ajudar.

À minha mãe Marilda, meu pai Prudente (falecido) e meus irmãos Eliana, Maria Cecília, Ricardo e Fernando, por todo o incentivo dado.

Aos meus filhos Felipe e Gustavo, por serem os filhos amorosos que são, e que fazem os desafios da vida valerem à pena.

Ao meu querido marido Cícero, por ser o maior responsável em me fazer aceitar novos desafios, e por sempre me dar todo o apoio necessário.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram com a minha formação e com este trabalho.

À Deus.

“Qualquer um pode contar as sementes em uma maçã, mas só Deus pode contar o número de maçãs em uma semente.”

Robert H. Schuller

RESUMO

A eletroporação ou eletropermeabilização é o aparecimento de poros em membranas celulares devido a um potencial transmembrana elevado (200 mV – 1 V), causado pela aplicação de um campo elétrico externo. Essa tecnologia é utilizada na eletroquimioterapia, na vacina de DNA e na transferência genética. Este trabalho tem o objetivo de estudar o efeito da variação do campo elétrico, da concentração de células e da condutividade da solução extracelular na condutividade de suspensões de células biológica como forma de visualizar o fenômeno da eletroporação, utilizando um sistema de microdispositivo. Utilizou-se um microdispositivo de eletrodos com cerca de 200 μm de distância para aplicar pulsos quadrados de 900 μs e intensidade variável, em amostras de eritrócitos em suspensão. As amostras foram elaboradas em suspensões de 4 concentrações de células em 3 soluções de condutividade diferentes. Medições de condutividade da suspensão das amostras foram utilizadas para avaliar o efeito da eletroporação. Observou-se a mudança da condutividade da suspensão de células com o aumento do campo elétrico. Durante os pulsos de eletroporação, concluiu-se que diferentes frações volumétricas levaram a diferentes condutividades da suspensão de células. As leituras de condutividade apresentaram resultados coerentes com o esperado para frações volumétricas $p \geq 0,19$, principalmente para condutividade extracelular $\sigma_o = 1,4 \text{ S/m}$. O aumento da fração volumétrica diminuiu a condutividade da suspensão, mesmo durante a eletroporação. Entretanto, para $p = 0,07$, os resultados de condutividade foram maiores que o esperado. Acredita-se que este fato esteja ligado a reações eletroquímicas na solução. É possível que a oxirredução na interface entre o eletrodo de cobre e a solução eletrolítica tenha afetado a leitura da condutividade. Essa oxidação é reduzida em soluções mais condutoras.

Palavras-chave: eletroporação, suspensão de células, microfluído, microdispositivo, condutividade.

ABSTRACT

The electroporation or eletropermeabilization is the appearance of pores in cell membranes due to a high transmembrane potential ($200\text{ mV} - 1\text{ V}$), caused by applying an external electric field. This technology is used in electrochemotherapy, in DNA vaccine and in genetic transfer. This work aims to study the effect of varying the electric field, the cell concentration and conductivity of the extracellular solution conductivity of biological cell suspensions as a way to view the phenomenon of electroporation using a microdevice system. We used a microdevice with $200\text{ }\mu\text{m}$ between electrodes to apply squares pulses of $900\text{ }\mu\text{s}$ and intensity variation, in suspended erythrocyte samples. These samples were prepared with suspensions in 4 cells concentrations using 3 solutions with difference conductivity. The measurements of suspension samples conductivity were used to evaluate the effect of electroporation. We observed the change of the cell suspension conductivity as increased electric field. During the electroporation pulse, it was concluded that the different volume fractions lead to different conductivities of the cell suspension. The conductivity readings showed us consistent results with expectations for $p \geq 0.19$, especially for $\sigma_o = 1.4\text{ S/m}$. The increase of volume fraction of the suspension conductivity decreases even during the electroporation. However, for $p = 0.07$, conductivity results are greater than we expected. It believes that this fact is linked to electrochemical reactions in solution. Probably the redox between the interface the copper electrode and the electrolytic solution might affect the reading of conductivity. This oxidation is reduced by higher conductive solutions.

Keywords: electroporation, cell suspension, microfluidic, microdevice, conductivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da transfecção celular.	21
Figura 2 – Eletroporação reversível e irreversível pela aplicação de um campo elétrico.	22
Figura 3 – Cargas elétricas da interface eletrodo/solução.	23
Figura 4 – Célula esférica com raio a , espessura da membrana h , E_0 é o campo elétrico aplicado e θ é o ângulo entre a direção do vetor campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana.	26
Figura 5 – A aplicação de diferença de potencial em eletrodos de área A e distância d entre eles gera um campo elétrico dependente da fração volumétrica.	28
Figura 6 – Detalhe da placa de circuito impresso.....	33
Figura 7 – Visualização de detalhe do microdispositivo destacando região da suspensão de células.	33
Figura 8 – Diagrama que compreende o circuito de acionamento, a resistência de leitura e o microdispositivo.....	34
Figura 9 – Circuito de acionamento detalhado.....	35
Figura 10 – Equipamento AGILENT 4294B de espectrometria de impedância.....	37
Figura 11 – Ponteira AGILENT 16047E.	38
Figura 12 – (a) Leitura na tensão aplicada V_1 , e (b) corrente na amostra de suspensão de células, em relação ao tempo durante à aplicação do pulso, para $p = 0,19$, $\sigma_0 = 0,2 \text{ S/m}$ e tensão aplicada V_1 de 60 V	39
Figura 13 – Relação da condutividade da suspensão de células e o campo elétrico aplicado com soluções extracelular diferentes, (a) fração volumétrica de $p = 0,07$, (b) $p = 0,19$, (c) $p = 0,35$ e (d) $p = 0,73$	40
Figura 14 – Relação da condutividade da suspensão de células e as frações volumétricas com campos elétricos diferentes agrupados pela solução extracelular (a) $\sigma_1 = 0,2 \text{ S/m}$, (b) $\sigma_2 = 1,1 \text{ S/m}$ e (c) $\sigma_3 = 1,4 \text{ S/m}$	42

- Figura 15 – Relação entre a condutividade da suspensão de células em [S/m] e a condutividade da solução extracelular $\sigma_1 = 0,2 \text{ S/m}$ e $\sigma_3 = 1,4 \text{ S/m}$ para as frações volumétricas de (a) $p = 0,07$ e (b) $p = 0,73$ em campos elétricos aplicados de $E_{\min} = 22 \text{ kV/m}$ e $E_{\max} = 348 \text{ kV/m}$44
- Figura 16 – Espectroscopia de impedância do microdispositivo com solução extracelular de $\sigma_3 = 1,4 \text{ S/m}$, para frequências entre 40 Hz e 60 kHz.....45
- Figura 17 – Espectroscopia de impedância do microdispositivo antes e após a sequência de pulsos, para suspensões de (a) $p = 0,07$ e (b) $p = 0,73$. As frequências indicadas são pontos de referência da alteração do comportamento da impedância. A seta indica o sentido de crescimento da frequência de 40 Hz a 110 MHz.46

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição	Unidade
E_0	Campo elétrico efetivo	V/m
E_a	Campo elétrico aplicado	V/m
V_m	Potencial transmembrana	V
t	Tempo do pulso	s
τ	Tempo de carregamento da membrana	s
a	Raio da célula esférica	m
h	Espessura da membrana	m
F	Função dependente das propriedades dimensionais e elétricas da célula e do meio circundante.	Adimensional
θ	Ângulo entre o campo elétrico aplicado e o vetor posição na membrana	Rad
σ_i	Condutividade intracelular	S/m
σ_o	Condutividade extracelular	S/m
σ_m	Condutividade da membrana	S/m
σ_1	Condutividade extracelular	S/m
σ_2	Condutividade extracelular	S/m
σ_3	Condutividade extracelular	S/m
σ	Condutividade da suspensão	S/m
p	Fração volumétrica da suspensão de células	Adimensional
A	Área do eletrodo	m ²
d	Distância entre eletrodos	m
R	Resistência da suspensão de células	Ω
f_c	Frequência de corte do filtro	Hz
V_1	Potencial de leitura no circuito	V
V_2	Potencial de leitura no circuito	V
$R_{sistema}$	Resistência do sistema	Ω
R_l	Resistência de leitura	Ω
k	Fator de proporcionalidade das medidas físicas do sistema	m ⁻¹

PUBLICAÇÕES

Ramos, Luciana Costa; Pintarelli, G. B.; da Luz, G.; Suzuki, D. O. H. Estudo da Condutividade Elétrica de Suspensões de Células Biológicas In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB 2014), Uberlândia-MG, 2014.

Ramos, Luciana Costa; Delgado, M. A.; Garcia, R. Avaliação de Tecnologia em Saúde na Fase de Utilização. Caso de estudo: Detector de Batimentos Fetais In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB 2014), Uberlândia-MG, 2014.

Ramos, Luciana Costa; Pintarelli, G. B.; Altenhofen, D.; Suzuki D. O. H. Micro Electro-Permeabilization System for Cell Medium Conductivity Change Measurement of Erythrocytes Cells. In: 1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies (WC2015), Springer Singapore. p. 87-90, 2016.

Anselmo, J.; **Ramos, Luciana Costa;** Marques, J. L. B.; Silva, F. R. M. B.; Suzuki, D. O. H. Membrane Conductance Analysis on Single-cell Electroporation with Electrolyte-filled Capillary. ACES - The Applied Computational Electromagnetics Society. v.31 n. 6, p.684-691, julho 2016.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	21
1.1	Objetivo Geral	24
1.2	Objetivos Específicos	24
2	Fundamentação teórica.....	25
2.1	Teoria sobre o potencial transmembrana, eletroporação em célula isolada e em suspensão de células.....	25
2.2	Condutividade de suspensões.....	27
2.3	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	29
3	Metodologia	31
3.1	Células e Frações Volumétricas	31
3.2	Microdispositivo.....	32
3.3	Medição da Condutividade Elétrica	36
3.4	Espectrometria de Impedância Eletroquímica.....	37
4	Resultados	39
4.1	Condutividade da suspensão agrupada pela fração volumétrica	40
4.2	Condutividade da suspensão agrupada pela solução extracelular ...	42
4.3	Variação da Condutividade	43
4.4	Espectroscopia de Impedância	45
5	Discussão e Conclusões	47
5.1	Discussão.....	47
5.2	Conclusões	49
	Referências Bibliográficas	51

1 INTRODUÇÃO

A transfecção celular, transferência de moléculas externas à célula para dentro dela, representada na Figura 1, é uma tecnologia importante para a maioria dos estudos de biologia celular. Métodos tradicionais de transfecção química são tóxicos e ineficientes, especialmente em células primárias e em células-tronco. Embora a transfecção viral tenha uma eficiência mais elevada, este procedimento é experimentalmente difícil e não adequado para moléculas de proteína ou de fármacos (XU; LU; XING, 2014). Como uma tecnologia alternativa, a eletroporação é uma abordagem atóxica, econômica, eficiente e conveniente, que utiliza pulsos elétricos para que a transfecção celular ocorra.

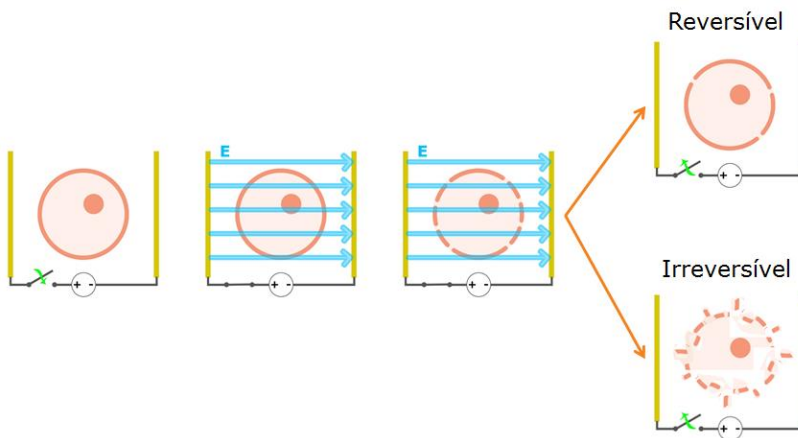
Figura 1 – Representação da transfecção celular.



Fonte: Adaptado de www.pinterest.com.

A eletroporação ou eletropermeabilização é o aparecimento de poros em membranas celulares devido a um potencial transmembrana elevado (200 mV – 1 V) causado pela aplicação de um campo elétrico externo (CHEN *et al.*, 2006). O fenômeno pode ser reversível ou irreversível, como visto na Figura 2, de acordo com as características do campo aplicado (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996). A abertura reversível de poros possibilita a transferência através da membrana de íons e moléculas solúveis em água, tais como uma série de drogas, DNA, anticorpos e plasmídeos (SUZUKI *et al.*, 2011). Após a retirada do estímulo externo, os poros se fecham e a membrana se restabelece. A aplicação da eletroporação reversível é utilizada na eletroquimioterapia, na vacina de DNA e na transferência genética. Estudar os mecanismos envolvidos na eletroporação reversível permite entender a tecnologia com o intuito de melhorar a eficiência da transfecção.

Figura 2 – Eletroporação reversível e irreversível pela aplicação de um campo elétrico.



Fonte: TCC de Guilherme Brasil Pintarelli, 2014.

No entanto, os atuais sistemas comerciais de eletroporação são de uso limitado, devido a vários problemas técnicos (GENG *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2008). Por exemplo, as plataformas de eletroporação mais utilizadas são do tipo eletroporador em cubeta. Elas não são adequadas para a experimentação de alto rendimento, porque a distância entre eletrodos na ordem de milímetros (mm) requer volumes de suspensão na ordem de mililitros (mL), grande quantidade de material biológico, de solução e de reagentes (SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014; XU *et al.*, 2015).

O equipamento de acionamento precisa de tensões na ordem de quilovolts (kV), e a corrente que o gerador deve fornecer depende da condutividade da solução extracelular. No caso de soluções fisiológicas, a corrente pode variar entre alguns miliamperes (mA) até algumas dezenas de amperes (A) (KOTNIK; BOBANOVIĆ; MIKLAVČIČ, 1997). Desta forma, os equipamentos comerciais destinados à eletroporação necessitam de soluções especiais, chamadas de *buffers* de eletroporação, pois dificilmente permitem faixas tão extensas de tensão e corrente (REBERŠEK *et al.*, 2014).

Uma forma de minimizar as dificuldades do uso de cubetas é reduzir a distância entre eletrodos para a ordem de micrômetros (μm). Esses dispositivos são usualmente referenciados como *miniaturized total analysis systems* (mTASs), *lab-on-a-chip* (LOC) ou simplesmente

microdispositivo. Desta maneira, as tensões e correntes gerados pelo equipamento se reduzem para valores convencionais e o volume necessário de amostra para o experimento também diminui para a ordem de microlitros (μL) (GENG; LU, 2013). Na pesquisa biológica, usar volumes reduzidos de amostra biológica significa a possibilidade de aumentar a quantidade de experimentos, e, assim, maximizar a obtenção de informação das amostras. Este sistema ainda permite utilizar o próprio meio de cultura das células na aplicação da eletroporação, fornecendo ao investigador controle da dinâmica do meio celular durante o processo de transfecção (SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014).

Entretanto, quando se trabalha com volumes na ordem de microlitros, deve-se considerar a tecnologia de microfluidos, que é caracterizado pelo estudo e manipulação de fluídos na escala de submilímetro (SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014). As cargas elétricas próximas aos eletrodos passam a ser significativas (MIRTAHERI; GRIMNES; MARTINSEN, 2005). A concentração de células (PAVLIN; SLIVNIK; MIKLAVČIČ, 2002) e a condutividade da solução extracelular (QIN *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2011) são variáveis importantes no efeito resultante da aplicação de pulsos elétricos em suspensão de células biológicas.

Figura 3 – Cargas elétricas da interface eletrodo/solução.



Fonte: do próprio autor.

O fenômeno da eletroporação somente será controlado quando o sistema eletroporador e o meio biológico utilizados são conhecidos. A tensão transmembrana resultante é influenciada pela diferença de potencial aplicado entre os eletrodos e a distância entre eles. E também é influenciada pelo tipo e tamanho da célula utilizada, pela concentração da suspensão e pela condutividade da solução extracelular. O objetivo deste trabalho é verificar as alterações das características elétricas de várias

suspensões de células utilizando um sistema de microdispositivo para melhor entender o fenômeno da eletroporação.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da variação do campo elétrico, da concentração de células e da condutividade da solução extracelular na condutividade de suspensões de células biológica como forma de visualizar o fenômeno da eletroporação, utilizando um sistema de microdispositivo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral, é necessária a contemplação dos seguintes objetivos específicos:

- Elaboração de metodologia para realização dos experimentos para o estudo da eletroporação em microdispositivo;
- Aquisição das curvas de tensão e corrente das suspensões de células durante a aplicação de pulsos elétricos de diferentes intensidades em amostras com 4 frações volumétricas e em solução extracelular de 3 condutividades;
- Análise das curvas de condutividade da suspensão resultantes das leituras de tensão e corrente;
- Aquisição da espectrometria de impedância eletroquímica do microdispositivo com suspensões antes e após a aplicação dos pulsos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os experimentos em eletroporação podem ser divididos em duas categorias (WANG *et al.*, 2010): em células isoladas (*single-cellelectroporation* – SCEP) e em células em suspensão (*bulk electroporation* – BE). Quando se trabalha com células isoladas, obtêm-se resultados microscópicos do fenômeno de uma única célula (ANSELMO *et al.*, 2016), enquanto em células em suspensão, as evidências do fenômeno são macroscópicas e seu resultado é para um grupo de células (BÖCKMANN *et al.*, 2008). Neste caso, é preciso considerar a interferência das células em suspensão na aplicação do campo elétrico.

Outros pontos importantes abordados são a forma de se obter a condutividade da suspensão e o que é a espectrometria de impedância eletroquímica em microdispositivos.

2.1 TEORIA SOBRE O POTENCIAL TRANSMEMBRANA, ELETROPORAÇÃO EM CÉLULA ISOLADA E EM SUSPENSÃO DE CÉLULAS

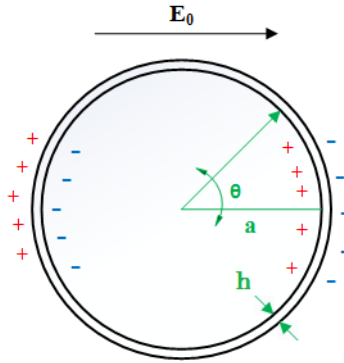
Uma célula imersa em uma solução externa condutora entre eletrodos paralelos com diferença de potencial é excitada por um campo elétrico externo praticamente uniforme (CHIEA; SUZUKI, 2012). Ocorrem movimentações iônicas na solução extracelular e íons acumulam-se em ambos os lados da membrana celular (RAMOS; SUZUKI; MARQUES, 2006), o que gera um potencial transmembrana. Usualmente em experimentos de eletroporação, o tempo de carregamento da membrana τ é pequeno em relação à duração do pulso t . O aumento da diferença de potencial na membrana é praticamente instantâneo.

A célula analisada será considerada esférica de raio a , com espessura da membrana h , em um campo elétrico uniforme efetivo E_0 . O potencial transmembrana induzido V_m é dado por:

$$V_m = 1,5 \cdot F \cdot a \cdot E_0 \cdot \cos\theta (1 - e^{-\tau}) \quad (2.1)$$

onde F é um fator dependente da condutividade e θ é o ângulo entre a direção do vetor campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana, relativo ao centro da célula, como visto na Figura 4.

Figura 4 – Célula esférica com raio a , espessura da membrana h , E_0 é o campo elétrico aplicado e θ é o ângulo entre a direção do vetor campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana.



Fonte: Adaptado de SUZUKI *et al.*, 2011.

Neumann (1992) apresentou F como uma função das condutividades intracelular (σ_i), da solução extracelular (σ_o), da membrana da célula (σ_m) e de h/a . Considerando $\sigma_m \leq \sigma_i, \sigma_o$:

$$F = \frac{2 \cdot \sigma_o \left[2 \cdot \sigma_m + \sigma_i + (\sigma_m - \sigma_i) \cdot \left(\frac{a-h}{a} \right)^3 - 3 \cdot \sigma_m \frac{a-h}{a} \right]}{(2 \cdot \sigma_m + \sigma_i) \cdot (2 \cdot \sigma_o + \sigma_m) + 2 \cdot \left(\frac{a-h}{a} \right)^3 \cdot (\sigma_i - \sigma_m) \cdot (\sigma_m - \sigma_o)} \quad (2.2)$$

Quando $a \gg h$, $\sigma_m \ll \sigma_o \ll \sigma_i$ (meio extracelular de baixa condutividade), Neumann apresentou a seguinte simplificação:

$$F = \left[1 + \frac{0,5 \cdot a \cdot \sigma_m}{h \cdot \sigma_o} \right]^{-1} \quad (2.3)$$

Para o estudo específico deste trabalho, a condutividade intracelular σ_i em células de eritrócitos de rato é de 0,6 S/m (ASAMI *et al.*, 1989). As condutividades da solução extracelular σ_o normalmente

usados em cubetas são menores que 0,2 S/m para evitar correntes de alta intensidade. Neste caso, aplica-se a simplificação apresentada na Equação 2.3. No sistema de microdispositivo também se utilizam soluções de condutividades maiores. A solução PBS (*phosphate buffered saline*) é isotônica e não tóxica às células, e tem condutividade de 1,4 S/m. Neste caso, a simplificação da equação não é possível e deve-se utilizar a Equação 2.2. Através da Equação 2.2, é possível verificar os principais fatores que influenciam o potencial transmembrana V_m e, consequentemente, a eletroporação: raio da célula a , condutividade intracelular σ_i e condutividade da solução extracelular σ_o . Entre eles, a influência da condutividade da solução extracelular σ_o é a mais significativa.

Quando V_m ultrapassa certo potencial crítico ocorre a permeabilização da membrana plasmática. Estudos experimentais demonstram que na eletroporabilidade reversível, o potencial crítico deve estar entre 200 mV e 1 V, conforme Teissie, Golzio e Rols (2005) e 400 mV, de acordo com Pliquett (2015).

2.2 CONDUTIVIDADE DE SUSPENSÕES

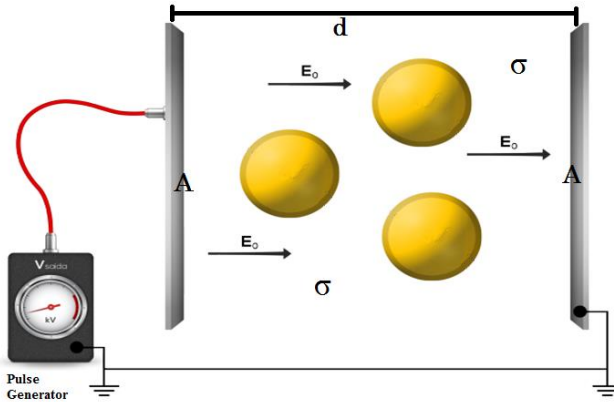
A eletroporação em células biológicas em suspensão (*bulk electroporation*) é uma técnica que possibilita a eletroporação de uma grande quantidade de células com um único pulso. O campo elétrico efetivo E_0 que incide na célula depende da fração volumétrica¹, ou seja, da quantidade de células diluídas na solução, conforme mostra a Figura 5. Quanto mais células diluídas em um mesmo volume, maior a proximidade entre elas. Por isso, será menor o campo elétrico efetivo E_0 para um mesmo campo elétrico aplicado E_a . O potencial transmembrana V_m é menor devido às barreiras que as células fazem à passagem da corrente elétrica (SCHMEER *et al.*, 2004). O campo elétrico efetivo foi calculado por Ramos, Suzuki e Marques (2006) utilizando a Equação 2.4.

$$E_0 = E_a \cdot (1 - 0,38p) \quad (2.4)$$

¹ Fração volumétrica – relação entre o volume interno da célula e o volume específico ocupado pela célula na suspensão.

onde p é a fração volumétrica da suspensão de células e E_a é o campo elétrico induzido ou aplicado.

Figura 5 – A aplicação de diferença de potencial em eletrodos de área A e distância d entre eles gera um campo elétrico dependente da fração volumétrica.



Fonte: Adaptado da Dissertação de Jânio Anselmo, 2014.

Em sistemas de eletroporação, a condutividade da suspensão σ é calculada a partir das propriedades geométricas dos eletrodos, ou seja, da área A e do espaçamento d entre eles, e também inversamente proporcional a resistência R entre eletrodos. A condutividade elétrica da suspensão σ é dada segundo a Equação 2.5., conforme a Figura 5.

$$\sigma = \frac{1}{R} \cdot \frac{d}{A} \quad (2.5)$$

Existe uma diferença entre a leitura da condutividade através de um pulso e de um condutivímetro. De forma geral, os condutivímetros apresentam a leitura tripolar na frequência de 2 kHz (DA ROCHA; GUTZ; DO LAGO, 1997). Esta leitura de condutividade foi efetuada nas soluções químicas sem células. A leitura com células produz componentes harmônicos importantes que podem afetar a leitura da condutividade (RAMOS *et al.*, 2012). Neste trabalho, a leitura da condutividade com pulsos é efetuada tendo como foco o entendimento da

transferência de moléculas para dentro das células. Os pulsos elétricos aplicados são os comercialmente utilizados em eletroquimioterapia e em eletroporadores (KOTNIK *et al.*, 2012). Estes pulsos unipolares intensos produzem alguns fenômenos relacionados com contaminação de eletrólito devido a eletrólise do eletrodo (KOTNIK; MIKLAVČIČ; MIR, 2001), reações químicas que ocorreram na solução (CHAFAI *et al.*, 2015), e aquecimento (SCHMEER *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2009).

2.3 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

A técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (*Electrochemical Impedance Spectroscopy* – EIS) é uma técnica de caracterização elétrica, que fornece um aspecto completo e detalhado das características elétricas do sistema. O conceito de impedância, originalmente introduzido para descrever a resposta de sistemas compostos por capacitâncias, resistências e indutâncias, estendeu-se aos sistemas eletroquímicos, uma vez que inúmeros processos podem contribuir para a relação entre a corrente e o potencial do sistema. A utilização desta técnica é bastante sensível às modificações que podem ocorrer na interface eletrodo/solução, possibilitando medir propriedades elétricas sem perturbação da interface. Dessa forma, estuda-se o comportamento geral de um sistema quando um número grande de processos intercorrelacionados ocorre em diferentes velocidades, mas não se alteram no tempo, pelo menos naquele necessário para que a medida seja realizada (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004).

Na EIS surge uma corrente de natureza senoidal como resultado da aplicação de um potencial senoidal ao sistema. Mediante um monitoramento das relações entre o potencial aplicado e a corrente são obtidos a impedância do sistema e o ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado). Assim, a partir das medidas da impedância e ângulo de fase, é possível avaliar processos como transporte de carga (incluindo estimativa de velocidade de transferência), condutividade de filmes, capacitância redox e de dupla camada, coeficientes de difusão de portadores de carga, entre outros (GUAN; MIAO; ZHANG, 2004).

Convencionalmente, a espectroscopia de impedância consiste em medidas de impedância em função da frequência do sinal, sobre um amplo intervalo de frequência. A faixa de trabalho em frequência depende tanto do objetivo da análise, do estudo do eletrólito ou das reações de interfaces,

como da impedância do sistema. No caso dos estudos das propriedades específicas do material, são utilizados valores entre 10 e 10^7 Hz, e para o estudo das reações de eletrodo, valores entre 10^{-4} e 10^4 Hz (BARSOUKOV; MACDONALD, 2005).

3 METODOLOGIA

Um microdispositivo foi desenvolvido para executar os experimentos deste trabalho. Além disso, foi estabelecida uma metodologia para a preparação do material biológico e execução dos experimentos de eletroporação. Todos os detalhes estão descritos nesta seção.

3.1 CÉLULAS E FRAÇÕES VOLUMÉTRICAS

O material biológico utilizado foi suspensões de eritrócitos ou hemácias de ratos obtidos a partir do sangue de rato Wistars albino macho. Os ratos foram animais de controle de pesquisas efetuadas no Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais da UFSC, ou seja, não receberam nenhum medicamento. A execução dos experimentos foi no mesmo dia em que o sangue foi colhido. Após centrifugação, o plasma foi descartado, o material foi ressuspenso em solução PBS e centrifugado novamente. Este procedimento foi realizado três vezes, suficiente para eliminar a maioria do plasma. O material resultante foi diluído para obter quatro frações volumétricas (concentrações), conforme Tabela 1. Os valores das frações volumétricas variaram entre pouca concentração de células, $p = 0,07$, e muita concentração de células, $p = 0,73$.

Tabela 1 – Frações volumétricas usadas nos experimentos.

p	Quantidade de células [10⁶ células/mm³]
0,07	0,51
0,19	1,37
0,35	2,60
0,73	5,30

Foram utilizadas três soluções isotônicas. As condutividades das soluções foram medidas pelo condutivímetro HANNA HI 8733, em temperatura ambiente de 25° C. Cada fração volumétrica foi preparada em soluções de condutividade elétrica diferentes, conforme Tabela 2. A condutividade das soluções variou entre pouco condutiva, $\sigma_1 = 0,2 \text{ [S/m]}$ e muito condutiva, $\sigma_2 = 1,4 \text{ [S/m]}$.

Tabela 2 – Condutividades e composição das soluções usadas nos experimentos.

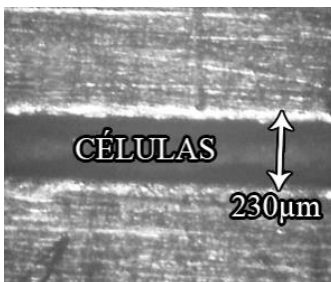
Soluções Extracelulares		
Condutividade [S/m]		Composição
σ_1	0,2	NaCl 13 mM Sacarose 150 mM NaOH 14mM
σ_2	1,1	NaCl 140mM KCl 6 mM MgCl2 1,5 mM CaCl2 1 mM Glucose 11,1 mM
σ_3 (PBS)	1,4	NaCl 137 mM Na2HPO4 12 mM KCl 2,7 mM

Todos os procedimentos executados foram de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) de protocolo CEUA PP00398, e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da UFSC.

3.2 MICRODISPOSITIVO

Um microdispositivo foi construído com a técnica de placa de circuito impresso (PCI). Através da comparação de fotos tiradas na mesma distância focal de uma Câmara de Neubauer e do microdispositivo, foi medido a distância entre os eletrodos de cobre em $230 \pm 25 \text{ }\mu\text{m}$, conforme a Figura 6.

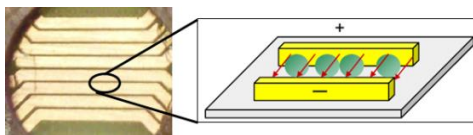
Figura 6 – Detalhe da placa de circuito impresso.



Fonte: do próprio autor.

Uma combinação de eletrodos foi utilizada, conforme a Figura 7.

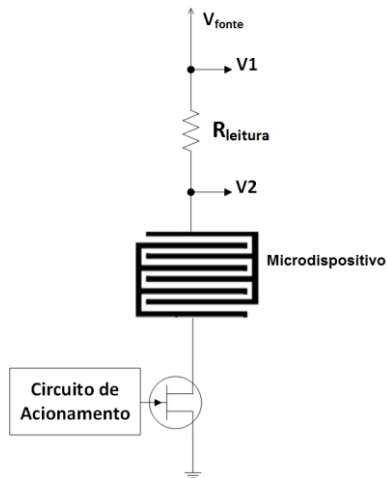
Figura 7 – Visualização de detalhe do microdispositivo destacando região da suspensão de células.



Fonte: do próprio autor.

As dimensões do microdispositivo são 30 mm por 20 mm. Este microdispositivo foi acoplado a uma resistência de leitura de valor conhecido (R_L , de valor $10,1 \, \Omega$ medido com multímetro FLUKE 179) e a um circuito de *hardware* para o seu acionamento, Figura 8.

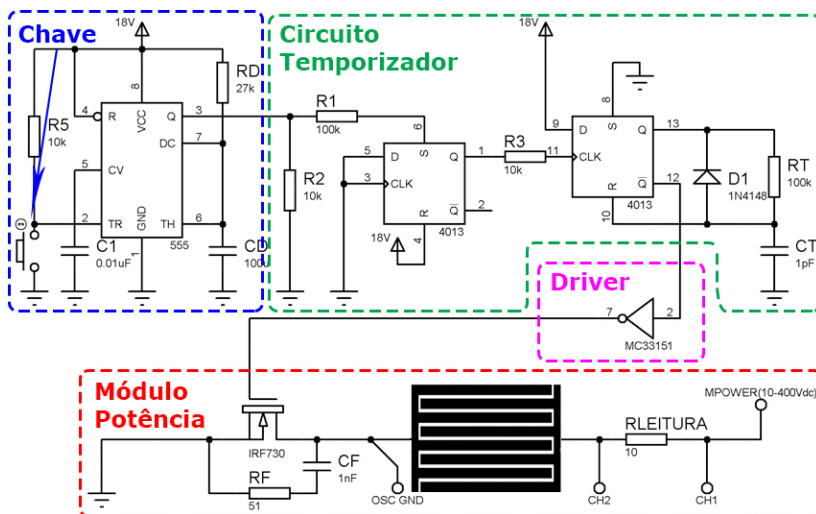
Figura 8 – Diagrama que compreende o circuito de acionamento, a resistência de leitura e o microdispositivo.



Fonte: do próprio autor.

No circuito de acionamento foi utilizado um *transistor* Mosfet IRF730 e um *drive* MC33151, conforme a Figura 9.

Figura 9 – Circuito de acionamento detalhado.



Fonte: TCC de Guilherme Brasil Pintarelli, 2014.

A leitura das tensões V_1 e V_2 foi realizada com um osciloscópio Tektronix TDS2004C. Um conjunto de pulsos quadrados de duração de 900 μs foi aplicado no microdispositivo para gerar campos elétricos entre 22 a 348 kV/m, $E_a \min$ e $E_a \max$, respectivamente.

A combinação das quatro frações volumétricas, Tabela 1, e as três soluções, Tabela 2, resultou em 12 amostras diferentes. Cada experimento utilizou o volume de 100 μL de células em suspensão da amostra homogeneizada colocado sobre o microdispositivo e aplicado um conjunto de pulsos. Foram definidos 6 valores de campo elétrico, Tabela 3, que foram escolhidos de forma que resultassem em tensão transmembrana com e sem eletroporação. Para cada valor de campo foram aplicados 3 pulsos de mesmo potencial, em sequência, espaçados em aproximados 2 minutos. Em seguida foram aplicados mais 3 pulsos com o próximo potencial. Assim, em ordem crescente, até atingir o valor máximo definido. Todos estes pulsos foram aplicados sobre uma mesma amostra de suspensão de células.

Tabela 3 – Intensidade do campo elétrico aplicado [kV/m] e número de pulsos que formaram a sequência de pulsos aplicados em cada experimento.

Campo Elétrico Aplicado [kV/m]	Número de Pulsos
22	3
44	3
87	3
174	3
261	3
348	3

Os experimentos foram realizados em amostras de várias concentrações de células, o que resultou em uma variação da incidência de campo elétrico efetivo para um mesmo campo elétrico aplicado. Considerando a Equação 2.4 em suspensões de fração volumétrica de $p = 0,07$ e $p = 0,73$, podem-se observar na Tabela 4 os campos elétricos efetivo máximo e mínimo resultantes.

Tabela 4 – Valores mínimo e máximo do campo elétrico efetivo E_o resultante do campo elétrico aplicado E_a .

Item	$p = 0,07$	$p = 0,73$
Equação	$E_o = 0,97.E_a$	$E_o = 0,73.E_a$
$E_o\ min$	20 kV/m	16 kV/m
$E_a\ max$	338 kV/m	254 kV/m

Usou-se a Equação 2.1 para o cálculo dos valores de potencial transmembrana V_m , no pólo da célula, $\theta = 0^0$, onde o campo elétrico é máximo.

3.3 MEDIÇÃO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA

A condutividade elétrica foi calculada a partir dos valores da resistência do sistema, $R_{sistema}$. Para cada pulso elétrico, fez-se a leitura das tensões V_1 e V_2 , conforme a Figura 8. Em cada campo elétrico determinado, calculou-se a resistência do sistema $R_{sistema} = V_2.R_l / V_1 - V_2$, com a média de três valores das tensões V_1

e V_2 obtidos pelos três pulsos, para minimizar o ruído do sistema. Aplicou-se um filtro passa-baixa de 5ª ordem com $f_c = 60 \text{ kHz}$ para reduzir a interferência externa.

Sabendo-se que $R_{\text{sistema}} = V_2 \cdot R_l / V_1 - V_2$ e $R_l = 10,1 \Omega$, calcularam-se os valores da resistência do microdispositivo.

A condutividade elétrica foi calculada a partir das tensões elétricas lidas no microdispositivo a $600 \mu\text{s}$. Este tempo foi escolhido como sendo o tempo em que não há influência do filtro e o sistema encontra-se estável (SUZUKI, 2009).

Para o cálculo da condutividade expressa na Equação 2.5, primeiramente foi calculado o fator de proporcionalidade das medidas físicas do sistema. Sendo a distância entre eletrodos de $230 \mu\text{m}$ e a área dos eletrodos de $14 \mu\text{m}^2$, calculou-se $k = 16,4$. E, então, calculou-se a condutividade da suspensão de células, cujos valores estão apresentados em Resultados.

3.4 ESPECTROMETRIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

A técnica utilizada para a análise das alterações elétricas causadas no sistema pela aplicação de pulsos elétricos foi a espectroscopia de impedância. As medidas foram feitas utilizando o espectrômetro de impedância AGILENT 4294B, Figura 10, conectado a um computador, aplicando uma corrente de polarização de 100 mA e variando a frequência de 40 Hz a 110 MHz .

Figura 10 – Equipamento AGILENT 4294B de espectrometria de impedância



Fonte: Agilent, 2016.

Com a ponteira AGILENT 16047E, Figura 11, foi feita a leitura do sistema de microdispositivo antes da aplicação dos pulsos e ao final da aplicação dos pulsos. Desta forma buscou-se observar a variação da impedância do sistema antes e depois da aplicação dos pulsos. O total de pulsos aplicado foram três pulsos em campos de 22, 44, 87, 174, 261 e 348 kV/m , em suspensão de células de frações volumétricas de $p = 0,07$ e $p = 0,73$, em solução de condutividade $\sigma_o = 1,4 S/m$. Os campos utilizados foram os mesmos aplicados no cálculo da condutividade. Utilizou-se as frações de menor e maior fração volumétrica para comparar as suspensões com poucas e muitas células.

Figura 11 – Ponteira AGILENT 16047E.



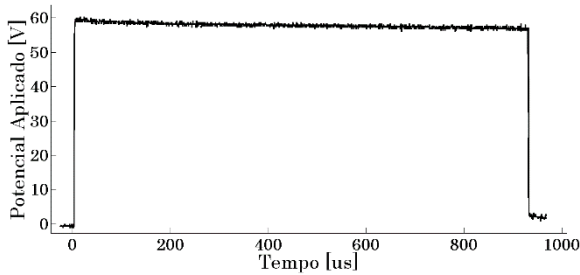
Fonte: Agilent, 2016.

4 RESULTADOS

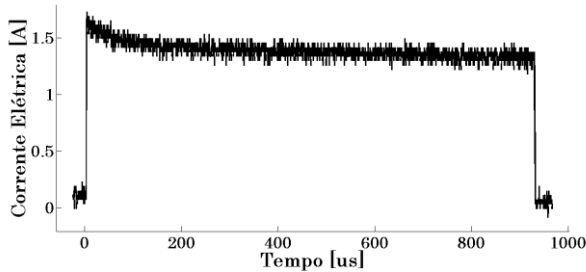
Durante a execução dos experimentos, a leitura das curvas de tensão V_1 e V_2 resultante da aplicação de cada pulso foi gravada pelo osciloscópio. Um exemplo do experimento feito com $p = 0,19$, $\sigma_o = 0,2 \text{ S/m}$ e tensão aplicada V_1 de 60 V é visto nas Figura 12 (a) a leitura de V_1 , e (b) a corrente resultante na resistência de leitura R_L .

Figura 12 – (a) Leitura na tensão aplicada V_1 , e (b) corrente na amostra de suspensão de células, em relação ao tempo durante à aplicação do pulso, para $p = 0,19$, $\sigma_o = 0,2 \text{ S/m}$ e tensão aplicada V_1 de 60 V .

(a)



(b)



Fonte: do próprio autor.

Após os experimentos serem realizados para toda a variação de campo elétrico proposto pela metodologia, para as quatro frações volumétricas utilizando as três soluções de diluição da suspensão com condutividades diferentes, calculou-se a condutividade das suspensões de células. Estes resultados podem ser agrupados de diferentes formas,

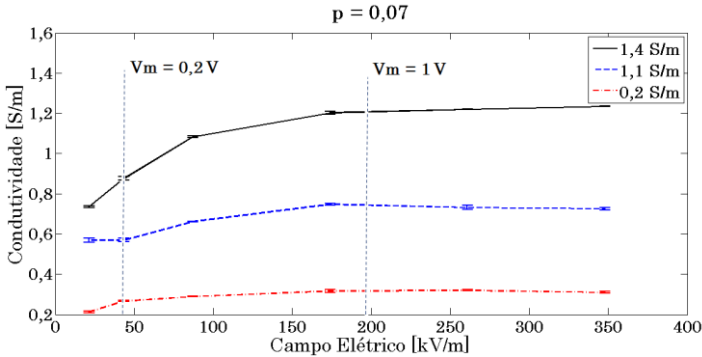
possibilitando visualizar melhor a influência do agrupamento na variação da condutividade da suspensão.

4.1 CONDUTIVIDADE DA SUSPENSÃO AGRUPADA PELA FRAÇÃO VOLUMÉTRICA

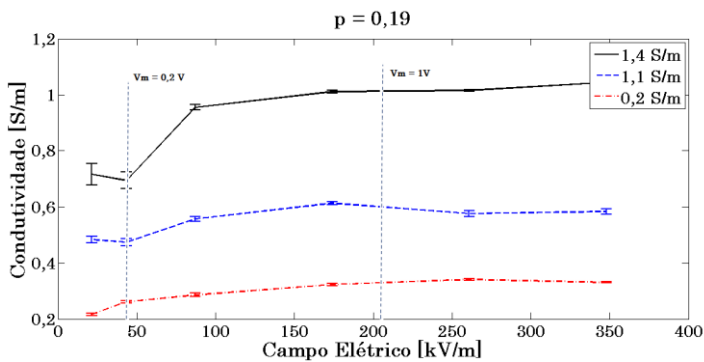
As Figura 13 (a) a (d) apresentam a relação entre a condutividade da suspensão de células e o campo elétrico aplicado E_a para cada fração volumétrica utilizada. Para uma mesma fração volumétrica, é possível observar a variação da condutividade da suspensão quando se altera a condutividade da solução extracelular. Os valores do intervalo do potencial transmembrana que produz poros, $V_m = 200 \text{ mV}$ e $V_m = 1 \text{ V}$, foram destacados.

Figura 13 – Relação da condutividade da suspensão de células e o campo elétrico aplicado com soluções extracelular diferentes, (a) fração volumétrica de $p = 0,07$, (b) $p = 0,19$, (c) $p = 0,35$ e (d) $p = 0,73$.

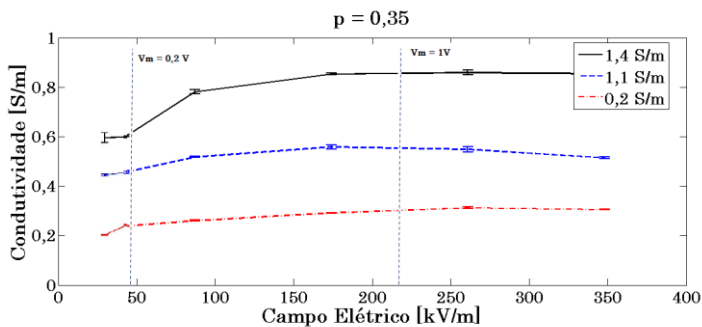
(a)



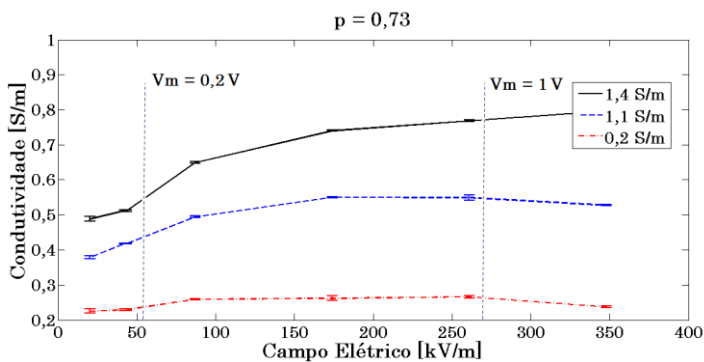
(b)



(c)



(d)



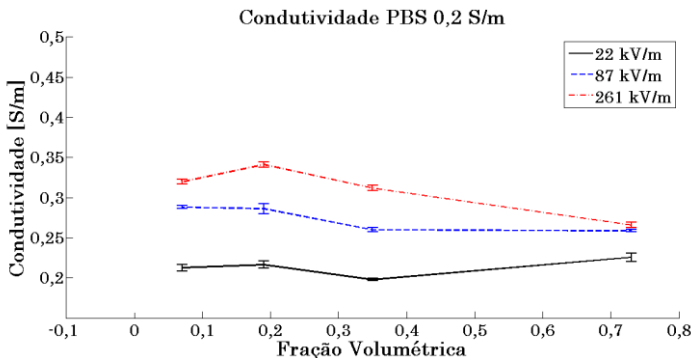
Fonte: do próprio autor.

4.2 CONDUTIVIDADE DA SUSPENSÃO AGRUPADA PELA SOLUÇÃO EXTRACELULAR

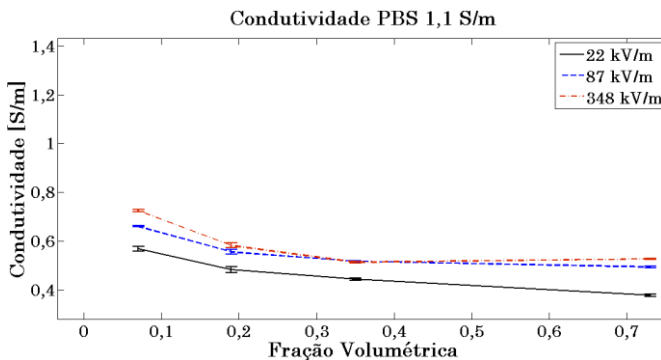
As curvas da condutividade da suspensão de células em relação à variação da fração volumétrica para cada solução extracelular de condutividade diferente podem ser vistas nas Figura 14 (a) a (c). Para uma mesma solução extracelular é possível observar a variação da condutividade da suspensão de células para diferentes campos elétricos aplicados. Para melhor visualização, algumas intensidades de campos elétricos foram suprimidas nos gráficos.

Figura 14 – Relação da condutividade da suspensão de células e as frações volumétricas com campos elétricos diferentes agrupados pela solução extracelular (a) $\sigma_1 = 0,2 \text{ S/m}$, (b) $\sigma_2 = 1,1 \text{ S/m}$ e (c) $\sigma_3 = 1,4 \text{ S/m}$.

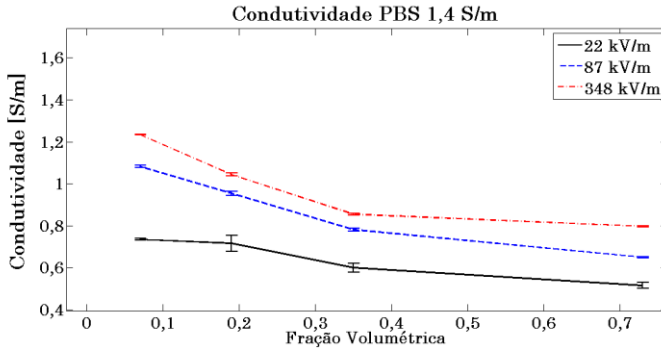
(a)



(b)



(c)



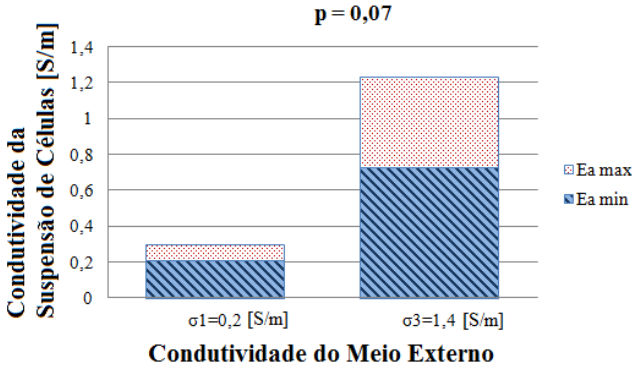
Fonte: do próprio autor.

4.3 VARIAÇÃO DA CONDUTIVIDADE

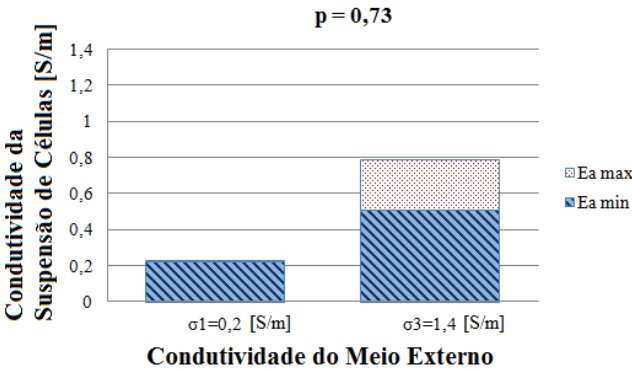
Uma outra forma de apresentar os resultados obtidos, com o intuito de entender melhor o efeito da alteração da solução extracelular na eletroporação em relação à fração volumétrica, foi selecionar os resultados das soluções de maior e menor condutividade da solução extracelular, $\sigma_1 = 0,2 \text{ S/m}$ e $\sigma_3 = 1,4 \text{ S/m}$ em frações volumétricas de maior e menor concentração, $p = 0,07$ e $p = 0,73$. O resultado da variação do campo elétrico aplicado $E_{a\min} = 22 \text{ kV/m}$ e $E_{a\max} = 348 \text{ kV/m}$ podem ser visto nas Figura 15 (a) e (b).

Figura 15 – Relação entre a condutividade da suspensão de células em [S/m] e a condutividade da solução extracelular $\sigma_1 = 0,2 \text{ S/m}$ e $\sigma_3 = 1,4 \text{ S/m}$ para as frações volumétricas de (a) $p = 0,07$ e (b) $p = 0,73$ em campos elétricos aplicados de $E_{a\min} = 22 \text{ kV/m}$ e $E_{a\max} = 348 \text{ kV/m}$.

(a)



(b)

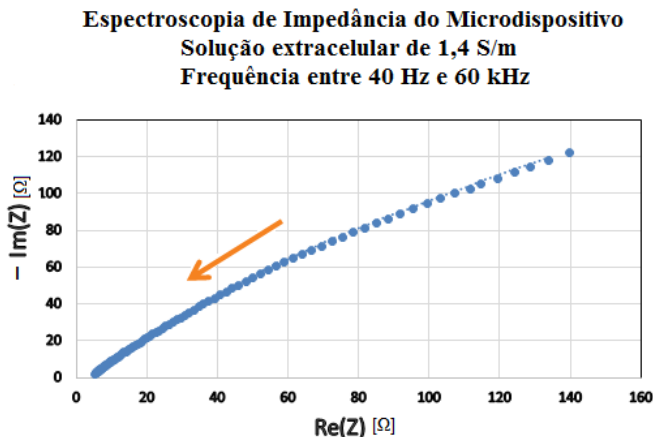


Fonte: do próprio autor.

4.4 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA

Para verificar qual é a característica elétrica do sistema, foi realizada a leitura do microdispositivo apenas com solução extracelular de condutividade $\sigma_3 = 1,4 \text{ S/m}$, para frequência entre 40 Hz e 60 kHz, Figura 16. As demais frequências são filtradas por um filtro passa-baixa de $f_c = 60 \text{ kHz}$.

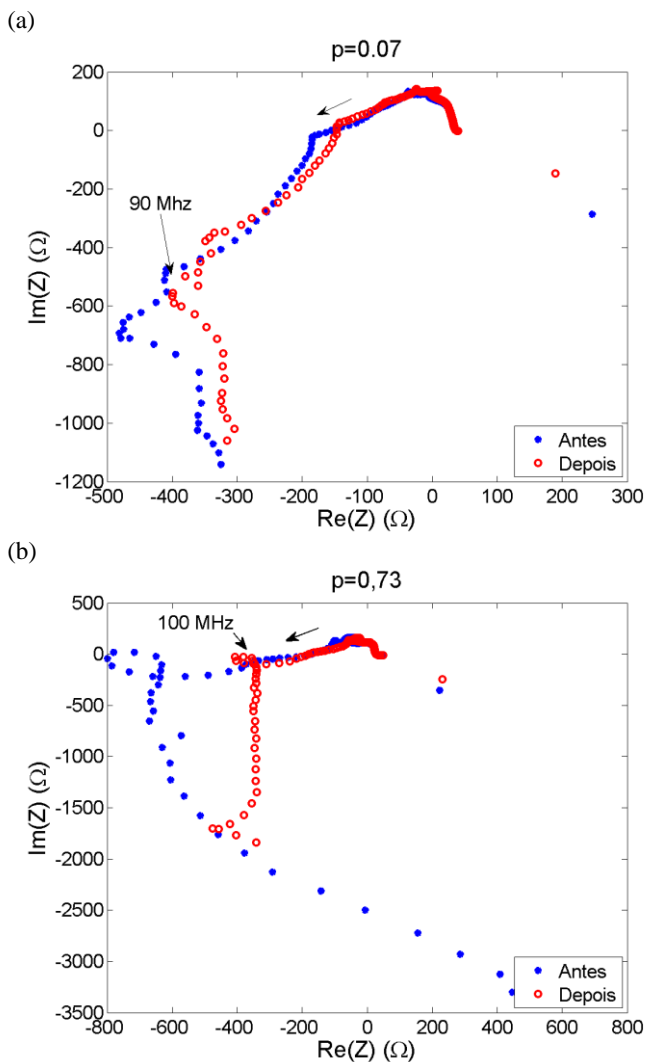
Figura 16 – Espectroscopia de impedância do microdispositivo com solução extracelular de $\sigma_3 = 1,4 \text{ S/m}$, para frequências entre 40 Hz e 60 kHz.



Fonte: do próprio autor.

As curvas da Figura 17 são referentes às frações volumétricas de (a) $p = 0,07$ e (b) $p = 0,73$ antes e depois da aplicação dos pulsos.

Figura 17 – Espectroscopia de impedância do microdispositivo antes e após a sequência de pulsos, para suspensões de (a) $p = 0,07$ e (b) $p = 0,73$. As frequências indicadas são pontos de referência da alteração do comportamento da impedância. A seta indica o sentido de crescimento da frequência de 40 Hz a 110 MHz.



Fonte: do próprio autor.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste capítulo são discutidos os resultados obtidos e quais são as maiores influências na variação da condutividade da suspensão.

5.1 DISCUSSÃO

Com o objetivo de estudar as características do microdispositivo desenvolvido, observou-se o comportamento da variação da condutividade pelas variações do campo elétrico, da fração volumétrica e da condutividade do meio extracelular. O tempo dos pulsos e as tensões utilizadas foram definidos (KRASSOWSKA; FILEV, 2007) para que alguns valores de campo elétrico gerados fossem capazes de induzir a eletroporação. O microdispositivo ainda permitiu trabalhar com outros tipos de células em suspensão.

Dado a distância de $230\text{ }\mu\text{m}$ entre os eletrodos, o microdispositivo possibilitou que se obtivesse diferença de condutividade num volume inferior a $100\text{ }\mu\text{l}$ de suspensão. Apesar da amostra de células que sofrem eletroporação ser reduzida (RAMOS *et al.*, 2014), foi possível medir a alteração da corrente durante a aplicação do pulso.

O campo elétrico induzido $E_{a\text{min}}$ gerou um potencial transmembrana V_0 inferior a $0,2\text{ V}$, não sendo suficiente para produzir poros na membrana das células (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996). Ao aplicar o campo elétrico $E_{a\text{max}}$, o potencial transmembrana induzido foi superior a 1 V . Neste caso, foi assegurado que o limiar da eletroporação fosse atingido. A equação simplificada (CHEN *et al.*, 2006) do potencial transmembrana têm dependência maior da fração volumétrica da suspensão e da intensidade do campo elétrico. Existem evidências de que suspensão de células elaboradas com solução que apresenta características de alta condutividade ($1,4\text{ S/m}$) geram campos elétricos que proporcionam uma condutividade elevada da membrana celular (KINOSITA KAZUHIKO; TSONG; KINOSITA, 1979; PAVLIN; SLIVNIK; MIKLAVČIČ, 2002; SUZUKI *et al.*, 2011).

Os efeitos de condutividade em relação à abertura de poros e difusão das moléculas para dentro das células permanecem obscuros. Li (LI *et al.*, 2013) apresenta evidências de que, apesar do aumento da

condutividade da solução extracelular ser proporcional à condutividade da membrana, a entrada de iodeto de propídio na célula foi inferior.

Observa-se nas Figura 13 (a) a (d) a coerência das leituras da condutividade da suspensão em pequenos campos elétricos (22 kV/m), onde não ocorre a eletroporação. À medida que a concentração de células aumenta, existe uma redução da condutividade da suspensão. Para as mesmas frações volumétricas existe um aumento da condutividade da suspensão com o aumento da condutividade da solução extracelular σ_0 . Na solução extracelular $\sigma_3 = 1,4 \text{ S/m}$ fica evidente que a fração volumétrica influencia na eletroporação (RAMOS *et al.*, 2016). Para $p \geq 0,19$, as condutividades das suspensões para campos elétricos aplicados de 22 e 44 kV/m não mostraram diferença. No entanto, para $p = 0,07$ e campo elétrico de 44 kV/m produziu uma diferença significativa.

Sobre a Figura 15, conclui-se que os resultados de condutividade de suspensões de células foram diferentes nas duas frações volumétricas de células ($p = 0,07$, $p = 0,73$) em soluções de diluição diferentes (σ_1 , σ_3) para o mesmo campo elétrico. Em meio pouco condutivo (σ_1), aumentando o campo elétrico, induziu-se um aumento de condutividade maior na suspensão de menor concentração de células ($p = 0,07$). Maiores concentrações de células representam barreiras ao fluxo de corrente e menor incidência de campo elétrico, Figura 14, reduzindo a condutividade da suspensão (MAXWELL, 1873; PAVLIN *et al.*, 2005). O campo elétrico intenso ($E_a \text{ max}$) não induziu uma variação da condutividade da suspensão, não deixando claro o limiar da eletroporação em grandes concentrações de células. Na suspensão de células em meio mais condutivo (σ_3), em ambas as concentrações de células ($p = 0,07$ e $p = 0,73$), a variação da condutividade foi maior, o que evidenciou o limiar da eletroporação. Estes resultados mostram que o sistema apresentado neste trabalho teve melhores resultados do que em Suzuki (SUZUKI *et al.*, 2011), permitindo a utilização de soluções extracelulares de condutividades elevadas.

Chafai (CHAFAI *et al.*, 2015) demonstram experimentalmente que o aumento da condutividade da solução extracelular diminui o acúmulo de cargas na interface eletrodo – eletrólise. Outro fato descrito no experimento, em baixas condutividades, é que a provável toxicidade do material que desprende do eletrodo não foi detectada. Nos experimentos realizados neste trabalho, o foco é a medição da condutividade da suspensão durante a eletroporação. Nestes casos, a leitura em solução extracelular de maior condutividade apresenta menor interferência da dupla camada iônica formada nas interfaces.

Devido ao formato dos pulsos aplicados ser onda quadrada, várias frequências estão presentes no sistema. O microdispositivo possui características essencialmente capacitivas, como pode ser visto na Figura 16. É possível fazer uma compensação dos seus efeitos (HE; CHANG; LEE, 2006). Porém, para este trabalho fez-se uso do analisador de impedância com compensação na mesma amostra, antes e depois da eletroporação.

A análise da espectroscopia de impedância eletroquímica demonstrou que existe uma variação de leitura do microdispositivo com solução extracelular e com suspensão de células. O microdispositivo, como esperado, apresenta características capacitivas, Figura 16, apenas com solução extracelular. Entretanto, existe uma alteração de suas características elétricas efetivadas com suspensão de células, como descrita em Chafai *et al.* (2015). Observa-se a influência da eletroporação nas células, que ocorre principalmente em frequências acima de 90 – 100 MHz, Figura 17. Este efeito da alteração da impedância em altas frequências é mais evidente com concentração maior de células, Figura 17 (b), em relação a uma concentrações menor de células, Figura 17 (a). Maiores estudos deste efeito são necessários.

5.2 CONCLUSÕES

Os experimentos no microdispositivo executados neste trabalho demonstram uma variação da condutividade em função da variação do campo elétrico, da fração volumétrica da suspensão de células e da condutividade da solução extracelular. A distância reduzida entre os eletrodos (cerca de 200 μm) permitiu intensos campos elétricos com pequeno potencial elétrico. O uso do sistema permitiu concluir que, para melhor visualizar a eletroporação, é possível aumentar a resposta da condutividade das células em suspensão, aumentando a intensidade do campo elétrico, aumentando a condutividade da solução extracelular ou reduzindo a concentração de células em suspensão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSELMO, J. et al. H. Membrane Conductance Analysis on Single-cell Electroporation with Electrolyte-filled Capillary. **Applied Computational Electromagnetics Society Journal (ACES)**, v.31 n. 6, p.684-691, julho 2016.

ASAMI, K.; TAKAHASHI, Y.; TAKASHIMA, S. Dielectric properties of mouse lymphocytes and erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1010, n. 1, p. 49–55, 1989.

BARSOUKOV, E.; MACDONALD, J. Ross (Ed.) **Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications**. John Wiley & Sons, Inc., 2005. v. 1.

BÖCKMANN, R. A. et al. Kinetics, statistics, and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations. **Biophysical journal**, v. 95, n. August, p. 1837–1850, 2008.

CHAFAI, D. E. et al. Assessment of the electrochemical effects of pulsed electric fields in a biological cell suspension. **Bioelectrochemistry**, v. 106, p. 249–257, 2015.

CHEN, C. et al. Membrane electroporation theories: a review. **Medical & biological engineering & computing**, v. 44, n. 1-2, p. 5–14, mar. 2006.

CHIEA, R. A, D. O. H. SUZUKI, M. J. L. B. Eletroporação Em Células Biológicas. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA, 2012, Porto de Galinhas - PE. p. 1–5.

DA ROCHA, R. T.; GUTZ, I. G. R.; DO LAGO, C. L. A Low-Cost and High-Performance Conductivity Meter. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n. 5, p. 572, maio 1997.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970–979, 2004.

GENG, T.; LU, C. Microfluidic electroporation for cellular analysis and delivery. **Lab Chip**, v. 13, n. 19, p. 3803–3821, 2013.

GENG, T. et al. Flow-through electroporation based on constant voltage for large-volume transfection of cells. **Journal of Controlled Release**, v. 144, n. 1, p. 91–100, 2010.

GUAN, J.-G.; MIAO, Y.-Q.; ZHANG, Q.-J. Impedimetric biosensors. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 219–226, 2004.

HE, H.; CHANG, D. C.; LEE, Y.-K. Micro pulsed radio-frequency electroporation chips. **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 68, n. 1, p. 89–97, jan. 2006.

KIM, J. A. et al. A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 1353–1360, 2008.

KINOSITA, K.; TSONG, T. Y. Voltage-induced conductance in human erythrocyte membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 554, n. 2, p. 479–497, 1979.

KOTNIK, T.; BOBANOVIĆ, F.; MIKLAVČIČ, D. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields - A theoretical analysis. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, n. 2, p. 285–291, 1997.

KOTNIK, T.; KRAMAR, P.; PUCIHAR, G.; MIKLAVČIČ, D.; TAREK, M. Cell membrane electroporation - Part 1: The phenomenon. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v. 28, p. 14–23, 2012.

KOTNIK, T.; MIKLAVČIČ, D.; MIR, L. M. Cell membrane electroporabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses: Part II. Reduced electrolytic contamination. **Bioelectrochemistry**, v. 54, n. 1, p. 91–95, 2001.

KRASSOWSKA, W.; FILEV, P. D. Modeling electroporation in a single cell. **Biophysical journal**, v. 92, n. 2, p. 404–417, 2007.

LI, J.; TAN, W.; YU, M.; LIN, H. The effect of extracellular conductivity on electroporation-mediated molecular delivery. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1828, n. 2, p. 461–70, fev. 2013.

MAXWELL, J. C. **A treatise on electricity and magnetism**. Oxford: Clarendon Press. 1873.

MIRTAHERI, P.; GRIMNES, S.; MARTINSEN, O. G. Electrode polarization impedance in weak NaCl aqueous solutions. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 52, n. 12, p. 2093–2099, 2005.

NEUMANN, E. Guide to Electroporation and Electrofusion. In: **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 1992. p. 83-87

PAVLIN, M. et al. Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension. **Biophysical journal**, v. 88, n. 6, p. 4378–90, jun. 2005.

PAVLIN, M.; SLIVNIK, T.; MIKLAVČIČ, D. Effective conductivity of cell suspensions. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 49, n. 1, p. 77–80, 2002.

PLIQUETT, U. et al. Electroporation of subcutaneous mouse tumors by rectangular and trapezium high voltage pulses. **Bioelectrochemistry**, v. 62, n. 1, p. 83-93, 2004.

QIN, Y. et al. Transmembrane voltage induced on a cell membrane in suspensions exposed to an alternating field : A theoretical analysis. v. 67, p. 57–65, 2005.

RAMOS, A.; SCHNEIDER, A. L. S.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, J. L. B. Sinusoidal signal analysis of electroporation in biological cells. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 59, n. 10, p. 2965–73, out. 2012.

RAMOS, A.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, J. L. B. Numerical study of the electrical conductivity and polarization in a suspension of spherical cells. **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 68, n. 2, p. 213–7, maio 2006.

RAMOS, L. C.; PINTARELLI, G. B.; ALTENHOFEN, D.; SUZUKI, D. O. H. Micro Electro-Permeabilization System for Cell Medium Conductivity Change Measurement of Erythrocytes Cells. In: 1st WORLD CONGRESS ON ELECTROPORATION AND PULSED ELECTRIC FIELDS IN BIOLOGY, MEDICINE AND FOOD & ENVIRONMENTAL TECHNOLOGIES (WC2015), Springer Singapore, 2016. p. 87-90.

RAMOS, L. C.; PINTARELLI, G. B.; LUZ, G.; SUZUKI, D. O. H.; Estudo da condutividade elétrica de suspensões de células biológicas. In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA, 2014, Uberlândia- MG. p. 1–5.

REBERŠEK, M. et al. Cell membrane electroporation-Part 3: The equipment. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v. 30, p. 8–18, 2014.

SACKMANN, E. K.; FULTON, A. L.; BEEBE, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. **Nature**, v. 507, n. 7491, p. 181–189, 2014.

SCHMEER, M. et al. Mechanism for the conductivity changes caused by membrane electroporation of CHO cell-pellets. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 6, n. 24, p. 5564–5574, 2004.

SUZUKI, D. O. H. **Estudo da condutividade elétrica de suspensões de eritrócitos de ratos durante aplicação de campos elétricos intensos: Teoria, modelagem e experimentação**. 2009. 131 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SUZUKI, D. O. H. et al. Theoretical and experimental analysis of electroporated membrane conductance in cell suspension. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 58, n. 12, p. 3310–8, dez. 2011.

TEISSIE, J.; GOLZIO, M.; ROLS, M. P. Mechanisms of cell membrane electroporeabilization: a minireview of our present (lack of?) knowledge. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1724, n. 3, p. 270–80, 5 ago. 2005.

WANG, M. et al. G. Single-cell electroporation. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, n. 8, p. 3235–48, ago. 2010.

WANG, S. et al. Semicontinuous flow electroporation chip for high-throughput transfection on mammalian cells. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 11, p. 4414–4421, 2009.

WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. A. Theory of electroporation: A review. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, n. 2, p. 135–160, dez. 1996.

XU, Y.; LU, Y.; XING, W. An individually addressable suspended-drop electroporation system for high-throughput cell transfection. **Lab on a chip**, v. 14, n. 4, p. 686–90, 2014.

XU, Y. et al. Cell electroporation with a three-dimensional microelectrode array on a printed circuit board. **Bioelectrochemistry**, v. 102, p. 35–41, 2015.